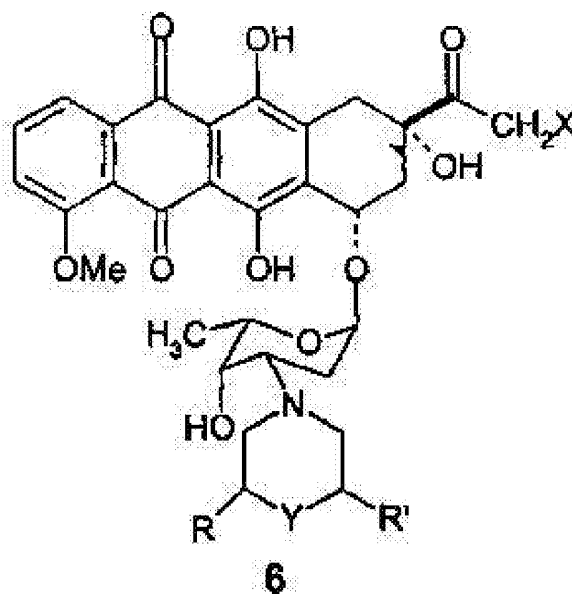


RESUMO**"AGENTES CITOTÓXICOS COMPREENDENDO DOXORRUBICINAS E DAUNORRUBICINAS MODIFICADAS E SEU USO TERAPÊUTICO"**

X=H; Compostos daunorrubicina

X=OH; Compostos doxorubicina

Y	R	R'
O ou NR ₂	H ou alquilo	-OCH ₂ CH ₂ CH(Me)SH
O ou NR ₂	H ou alquilo	-OCH ₂ CH ₂ CH(Me)SSZ
O ou NR ₂	-CH ₂ SH ou -CH ₂ CH(Me)SH	-H ou -OR ₁
O ou NR ₂	-CH ₂ SSZ ou -CH ₂ CH(Me)SSZ	-H ou -OR ₁

R, R₁ e R₂ podem ser quaisquer alquilos lineares ou ramificados até 5 átomos de carbono: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-, iso-, s- ou t-butilo, pentilo.

Um agente citotóxico compreendendo uma ou mais doxorubicinas/daunorubicinas modificadas ligadas a um agente de ligação celular. Uma composição terapêutica para matar populações de células seleccionadas compreendendo:

(A) uma quantidade citotóxica de uma ou mais doxorubicinas/daunorubicinas ligadas de forma covalente a um agente de ligação celular através de um grupo ligante, e

(B) um veículo farmacêuticamente aceitável. Um método para matar populações de células seleccionadas compreendendo pôr em contacto células alvo ou tecido contendo células alvo com uma quantidade eficaz de um agente citotóxico compreendendo uma ou mais doxorubicinas/daunorubicinas modificadas ligadas a um agente de ligação celular. Novas doxorubicinas/daunorubicinas modificadas contendo enxofre.

DESCRIÇÃO

"AGENTES CITOTÓXICOS COMPREENDENDO DOXORRUBICINAS E DAUNORRUBICINAS MODIFICADAS E SEU USO TERAPÊUTICO"

CAMPO DO INVENTO

O presente invento relaciona-se com novos agentes citotóxicos e seu uso terapêutico. Mais especificamente, o invento relaciona-se com novos agentes citotóxicos compreendendo doxorubicinas/daunorubicinas modificadas e seu uso terapêutico. Estes novos agentes citotóxicos têm uso terapêutico resultante da distribuição de doxorubicinas/daunorubicinas modificadas a uma população específica de células de forma dirigida ligando quimicamente a doxorubicina/daunorubicina a um agente de ligação celular.

ANTECEDENTES DO INVENTO

Apareceram muitos relatórios sobre a tentativa de reconhecimento específico de células tumorais com conjugados anticorpo monoclonal-fármaco (Sela et al, em *Immunoconjugates* 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al, em *Targeted Drugs* 1-22 (E. Goldberg, ed. 1983); Diener et al, em *Antibody mediated delivery systems* 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al, em *Antibody mediated delivery systems* 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988); Bumol et al, em

Antibody mediated delivery systems 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988). Fármacos citotóxicos tais como metotrexato, daunorrubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalan, mitomicina C, e clorambucil foram conjugados com uma variedade de anticorpos monoclonais murínicos. Nalguns casos, as moléculas de fármaco foram ligadas às moléculas de anticorpo através de uma molécula intermediária de transporte tal como albumina do soro (Garnett et al, 46 *Cancer Res.* 2407-2412 (1986); Ohkawa et al, 23 *Cancer Immunol. Immunother.* 81-86 (1986); Endo et al, 47 *Cancer Res.* 1076-1080 (1980)), dextran (Hurwitz et al, 2 *Appl. Biochem.* 25-35 (1980); Manabi et al, 34 *Biochem. Pharmacol.* 289-291 (1985) ; Dillman et al, 46 *Cancer Res.* 4886-4891 (1986); Shoval et al, 85 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 8276-8280 (1988)), ou ácido poliglutâmico (Tsukada et al, 73 *J. Natl. Canc. Inst.* 721-729 (1984); Kato et al, 27 *J. Med. Chem.* 1602-1607 (1984); Tsukada et al, 52 *Br. J. Cancer* 111-116 (1985)).

Foi utilizada uma série de tecnologias de ligação para a preparação de tais imunoconjugados e foram investigadas os ligantes cliváveis e não cliváveis. Na maior parte dos casos, o potencial citotóxico total dos fármacos só podia ser contido observado, se as moléculas de fármaco pudessem ser libertadas dos conjugados numa forma não modificada no local alvo.

Um dos ligantes cliváveis que tem sido utilizada para a preparação de conjugados anticorpo-fármaco é um

ligante lábil em ácido baseado em ácido *cis*-aconítico que tira partido do ambiente ácido dos diferentes compartimentos intracelulares tais como os endossomas encontrados durante a endocitose mediada por receptor e os lisossomas. Shen e Ryser introduziram este método para a preparação de conjugados de daunorrubicina com veículos macromoleculares (102 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1048-1054 (1981)). Yang e Reisfeld usaram a mesma técnica para conjugar daunorrubicina a um anticorpo anti-melanoma (80 *J. Natl. Canc. Inst.* 1154-1159 (1988)). Dillman et al usaram também, de forma similar, um ligante lábil em ácido para preparar conjugados de daunorrubicina com um anticorpo anti-célula T (48 *Cancer Res.* 6097-6102 (1988)).

Uma aproximação alternativa, explorada por Trouet et al, envolveu a ligação de daunorrubicina a um anticorpo via um peptídeo espaçador (79 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 626-629 (1982)). Isto foi feito com a premissa que o fármaco livre podia ser libertado de tal conjugado pela acção de peptidases lisossomais.

Testes citotóxicos *in vitro*, contudo, revelaram que os conjugados anticorpo-fármaco raramente atingiam a mesma potência citotóxica do que os fármacos livres, não conjugadas. Isto sugeriu que os mecanismos pelos quais as moléculas de fármaco são libertados dos anticorpos são muito ineficazes. Na área de imunotoxinas, verificou-se que os conjugados formados via pontes dissulfureto entre anticorpos monoclonais e toxinas proteicas cataliticamente

activas eram mais citotóxicas do que os conjugados contendo outros ligantes. (Ver, Lambert et al, 260 *J. Biol. Chem.* 12035-12041 (1985); Lambert et al, em *Immunotoxins* 175-209 (A. Frankel, ed. 1988) ; Ghetie et al, 48 *Cancer Res.* 2610-2617 (1988)). Isto foi atribuído à concentração intracelular elevada de glutathione contribuindo para a clivagem eficaz da ponte dissulfureto entre uma molécula de anticorpo e uma toxina. Apesar disto, existem apenas alguns exemplos reportados do uso de pontes dissulfureto para a preparação de conjugados entre fármacos e macromoléculas. Shen et al (260 *J. Biol. Chem.* 10905-10908 (1985)) descreveu a conversão de metotrexato num derivado mercapto-etilamida seguido por conjugação com poli-D-lisina via uma ligação dissulfureto. Um outro relatório descreve a preparação de um conjugado do fármaco tóxico calicheamicina contendo trissulfureto com um anticorpo (Hinman et al, 53 *Cancer Res.* 3336-3342 (1993)).

Uma razão para a ausência de conjugados anticorpo-fármaco ligados por sulfureto é a inexistência de fármacos citotóxicos possuindo uma parte contendo um átomo de enxofre que possa ser facilmente usada para ligar o fármaco ao anticorpo via uma ponte dissulfureto. Além disso, a modificação química dos fármacos existentes é difícil sem diminuir o seu potencial citotóxico.

Uma outra desvantagem principal com conjugados anticorpo-fármaco existentes é a sua incapacidade para distribuir uma concentração suficiente de fármaco ao local

alvo por causa do número limitado de antígenos alvo e da citotoxicidade relativamente moderada de fármacos citostáticos como metotrexato, daunorrubicina, doxorubicina e vincristina. De modo a atingir citotoxicidade significativa, torna-se necessária a ligação de um grande número de moléculas de fármaco quer directamente ao anticorpo quer através de uma molécula transportadora polimérica. Contudo tais anticorpos fortemente modificados apresentam frequentemente ligação enfraquecida ao antígeno alvo e remoção rápida *in vivo* da corrente sanguínea.

Apesar das dificuldades acima descritas, foram relatados agentes citotóxicos úteis compreendendo partes de ligação a células e foi reportado o grupo de fármacos citotóxicos conhecido como maitansinóides (USP 5 208 020; USP 5 416 064; e R. V. J. Chari, 31 *Advanced Drug Delivery Reviews* 89-104 (1988)). De forma similar, foram também reportados agentes citotóxicos úteis compreendendo partes de ligação a células e análogos e derivados do potente antibiótico anti-tumoral CC-1065 (USP 5 475 092 e USP 5 585 499).

Doxorubicina (Adriamicina) e daunorrubicina (Daunomicina) são produtos naturais citotóxicos que são largamente usados no tratamento do cancro. Estes compostos pertencem à família de compostos chamados antraciclinas. As antraciclinas são agentes de interacção com o DNA que intercalam no DNA e interferem com a sua função template causando a morte celular.

A US-A-4 672 057 revela glicosídeos de antraciclinas que incluem análogos de doxorrubicina e daunorubicina diferindo na presença de um grupo metano cetónico ou metanol, os quais são caracterizados por um grupo morfolino o qual é substituído na posição alfa relativamente ao O do morfolino por substituintes hidrogénio ou metilo de um lado e metoxilo do outro lado. Estes compostos são revelados como agentes citotóxicos úteis para matar populações celulares seleccionadas e podem ser apresentados na forma de uma composição farmacêutica.

A EP-A-0434960 revela de forma similar glicosídeos de antraciclinas na forma de doxorrubicinas compreendendo um grupo metanol cetónico. Neste caso os compostos incluem o grupo morfolino e este é monosubstituído na posição alfa relativamente ao O morfolino por um grupo etoxilo OC_1-C_6 alquilo. Os compostos são revelados como agentes anti-tumorais úteis para matar populações de células seleccionadas e podem ser apresentados na forma de uma composição farmacêutica.

Enquanto a doxorrubicina e a daunorubicina são agentes úteis no tratamento de cancro, a sua actividade anti-tumoral está limitada por causa da toxicidade não específica relativamente às células normais.

Além disso, os compostos como os próprios doxorrubicina e daunorubicina não são suficientemente potentes

para serem usados nos conjugados dos agentes de ligação celular. Várias tentativas para ligar estes compostos a anticorpos resultaram em conjugados com potência baixa e selectividade para o alvo pobre (R.S. Greenfield et al, 50 *Cancer Res.* 6600-6607 (1990); R.S. Greenfield et al, 50 *Cancer Res.* 6608-6614 (1990); R.V.J. Chari, 31 *Advanced Drug Delivery Revs.* 89-104 (1998)). Assim, estes conjugados provaram ser ineficazes em ensaios clínicos em humanos (A. W. Tolcher et al, 17 *J. Clin. Oncol.* 478-484 (1999)). Foram descritos alguns análogos de morfolino com potência maior do que a daunorrubicina ou doxorubicina (E.M. Acton et al, 27 *J. Med. Chem.* 638-645 (1984); E. M. Acton et al, 29 *J. Med. Chem.*, 1225-1230 (1985); E.M. Acton et al, 29 *J. Med. Chem.* 2074-2079 (1986); Patentes EUA: 4 464 529, 4 672 057, 5 034 687 (Fig. 1); e recentemente, foi descrita uma pirrolinodoxoreubicina ((5) na Figura 1) (A. Nagy et al, 93 *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2464-2469 (1996); Patente EUA 5 843 903). Contudo, estes compostos não têm uma funcionalidade que permita a ligação via uma ligação clivável aos agentes de ligação celular. Também, uma tentativa para ligar a morfolinodoxorrubicina a um anticorpo via um ligante lábil em ácido conduziu a um conjugado instável que era inactivo (B. M. Mueller et al, 1 *Bioconjugate Chem.* 325-330 (1990)).

De acordo com isto é muito necessário um método de tratar doenças com doxorubicinas/daunorrubicinas em que os seus efeitos secundários sejam reduzidos sem comprometer a sua toxicidade.

SUMÁRIO DO INVENTO

Um objectivo do presente invento é o de providenciar doxorubicinas/daunorubicinas modificadas que sejam altamente tóxicas e que possam ainda ser usadas de forma eficaz no tratamento de muitas doenças.

Um outro objectivo do presente invento é o de fornecer novas doxorubicinas/daunorubicinas modificadas.

Estes e outros objectivos foram atingidos providenciando um agente citotóxico compreendendo uma ou mais doxorubicinas ou daunorubicinas modificadas ligadas a um agente de ligação celular.

Num segundo modelo de realização, o presente invento fornece uma composição terapêutica compreendendo:

(A) uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma ou mais doxorubicinas ou daunorubicinas modificadas ligadas a um agente de ligação celular, e

(B) um veículo farmacologicamente aceitável.

Num terceiro modelo de realização, o presente invento fornece um método para matar populações de células seleccionadas compreendendo pôr em contacto células alvo ou tecidos contendo células alvo com uma quantidade eficaz de

um agente citotóxico compreendendo uma ou mais doxorubicinas ou daunorrubicinas modificadas ligadas a um agente de ligação celular.

Num quarto modelo de realização, o presente invento providencia doxorubicinas ou daunorrubicinas modificadas compreendendo um grupo ligante capaz de ligar as ditas doxorubicinas ou daunorrubicinas modificadas a uma parte química.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra a estrutura de vários análogos de doxorubicinas ou daunorrubicinas potentes (E.M. Acton et al (1984, 1985, e 1986), *supra*).

A Figura 2 é uma fórmula química que representa as estruturas de algumas das doxorubicinas/daunorrubicinas contendo dissulfureto de acordo com o presente invento. Os substituintes R_1 , R_2 e Z são como definido aqui.

A Figura 3 mostra a síntese de metilditionomorfolinodoxorubicina a partir de ribitol e doxorubicina.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

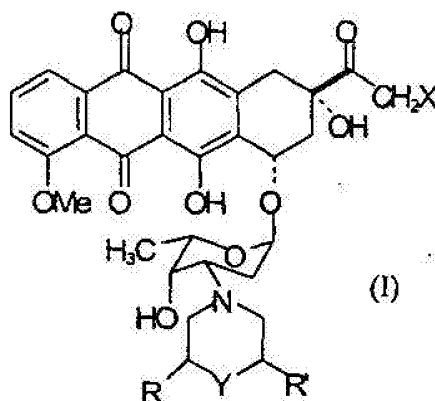
O invento baseia-se na síntese de novas doxorubicinas/daunorrubicinas modificadas que apresentam cito-

toxicidade intensificada e que se podem ligar de forma eficaz a agentes de ligação celular. A arte revela que é extremamente difícil modificar fármacos existentes sem diminuir o seu potencial citotóxico. Contudo, foi previamente mostrado que fármacos altamente citotóxicos podem ser modificados de modo a conduzir a novos fármacos que tenham uma potência equivalente ou superior à do fármaco precursor. Além disso, estes fármacos altamente citotóxicos podem ser ligados a agentes de ligação celulares usando uma ligação clivável, tal como uma ligação dissulfureto, assegurando a libertação de fármacos totalmente activos dentro da célula. Tais conjugados são citotóxicos de um modo específico ao antígeno (R.V.J. Chari et al, 52 *Cancer Res.* 127-131 (1992); USP 5 475 092; e USP 5 416 064). O invento revelado aplica esta tecnologia a doxorubicinas e daunorubicinas, que são modificadas com partes químicas, e especialmente aquelas contendo grupos tiol ou dissulfureto, aos quais podem ser ligados agentes de ligação celular apropriados. Como resultado disto, as novas doxorubicinas/daunorubicinas modificadas conservam e nalguns casos podem mesmo intensificar a potência citotóxica de doxorubicinas e daunorubicinas conhecidas. Os complexos doxorubicinas/daunorubicinas-agente de ligação celular permitem a medição total da acção citotóxica das doxorubicinas/daunorubicinas a ser aplicadas de modo dirigido apenas contra células não desejadas, evitando, portanto, os efeitos secundários devidos a lesões em células saudáveis às quais não se dirige. Este invento permite que as doxorubicinas/dau-

norrubicinas sejam dirigidas ao local e sejam ainda eficazes. Assim o invento fornece agentes úteis para a eliminação de células doentes ou anormais que devem ser mortas ou lisadas, tais como células tumorais (particularmente células de tumores sólidos), células infectadas com vírus, células infectadas com microorganismos, células infectadas com parasitas, células autoimunes (células que produzem auto-anticorpos), células activadas (aquelas envolvidas em rejeição de enxerto ou doença enxerto vs hospedeiro), ou qualquer outro tipo de células doentes ou anormais, enquanto apresentam efeitos secundários mínimos.

O agente citotóxico de acordo com o presente invento compreende uma ou mais doxorubicinas/daunorrubicinas modificadas ligadas a um agente de ligação celular via um grupo ligante. O grupo ligante é parte de uma parte química que está ligada de forma covalente a uma doxorubicina/daunorrubicina modificada através de métodos convencionais. Enquanto o fármaco pode ser ligado aos agentes de ligação celular via ligações cliváveis tais como ligações lábeis em ácidos, lábeis em estearase e lábeis em peptidase, o modo de ligação preferido é através de ligações dissulfureto.

As doxorubicinas/daunorrubicinas modificadas úteis no presente invento têm a fórmula (I) mostrada abaixo:



em que,

X é H ou OH;

Y é O ou NR₂, em que R₂ é alquilo linear ou ramificado tendo 1 a 5 átomos de carbono;

R é um grupo ligante, H, ou alquilo linear ou ramificado tendo 1 a 5 átomos de carbono; e

R' é um grupo ligante, H, ou -OR₁, em que R₁ é alquilo linear ou ramificado tendo 1 a 5 átomos de carbono;

desde que R e R' não sejam simultaneamente grupos ligante.

Exemplos de alquilo linear ou ramificado tendo 1 a 5 átomos de carbono, representados por R, R₁, e R₂, incluem metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, s-butilo, t-butilo, e pentilo, em qualquer uma das suas oito configurações isoméricas.

R_1 e R_2 são de preferência metilo.

Grupos ligantes adequados são bem conhecidos na arte e incluem grupos dissulfureto, grupos tioéter, grupos lábeis em ácido, grupos fotolábeis, grupos lábeis à peptidase e grupos lábeis à estearase. Preferidos são os grupos tioéter e os grupos dissulfureto. As posições preferidas para a introdução de um grupo tiol ou dissulfureto estão em R e R'.

Quando o grupo ligante é um grupo contendo tiol ou dissulfureto, a cadeia lateral contendo o grupo tiol ou dissulfureto pode ser linear ou ramificada, aromática ou heterocíclica. Um especialista ordinário na arte pode facilmente identificar cadeias laterais adequadas. Exemplos específicos de substituintes contendo tiol ou dissulfureto incluem $-(CH_2)_nSZ$, $-O(CH_2)_nSZ$, $-(CH_2)_nCH(CH_3)SZ$, $-O(CH_2)_nCH(CH_3)SZ$, $-(CH_2)_nC(CH_3)_2SZ$, ou $-O(CH_2)_nC(CH_3)_2SZ$, em que

Z é H ou SR_3 , em que R_3 é alquilo linear, ramificado ou cíclico tendo desde 1 até 10 átomos de carbono, ou arilo simples ou substituído tendo desde 1 até 10 átomos de carbono, ou heterocíclico tendo desde 1 até 10 átomos de carbono, e n é um inteiro de 1 até 10.

Exemplos de alquilos lineares incluem metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo e hexilo.

Exemplos de alquilos ramificados incluem isopro-

pilo, isobutilo, s-butilo, t-butilo, isopentilo e 1-etil-propilo.

Exemplos de alquilos cíclicos incluem ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo e ciclo-hexilo.

Exemplos de arilos simples incluem fenilo e naftilo.

Exemplos de arilos substituídos incluem arilos tais como aqueles descritos acima substituídos com grupos alquilo, com halogéneos, tais como Cl, Br, F, grupos nitro, grupos amino, grupos ácido sulfónico, grupos ácido carboxílico, grupos hidroxilo e grupos alcoxilo.

Exemplos de heterocíclicos são compostos em que os heteroátomos são seleccionados a partir de O, N e S, e incluem pirrolilo, piridilo, furilo e tiofeno.

As doxorubicinas/daunorubicinas modificadas do presente invento, que têm um substituinte contendo tiol ou dissulfureto são elas próprias novas. Exemplos de algumas doxorubicinas e daunorubicinas preferidas contendo tiol ou dissulfureto preferidas de acordo com o presente invento estão mostradas na Figura 2.

As doxorubicinas/daunorubicinas modificadas podem ser sintetizadas de acordo com métodos conhecidos. O material de partida para a síntese é a doxorubicina ou

daunorrubicina comercialmente disponível. Primeiro, é sintetizado um composto anidroribitol apropriado. É fornecido um exemplo na Fig. 3. o ribitol é então oxidado com periodato de sódio, como descrito previamente por E.M. Acton et al, supra. A reacção do dialdeído resultante com doxorubicina seguida pela redução com cianoboro-hidreto de sódio fornece a doxorubicina com o morfolino contendo dissulfureto (Fig. 3). O substituinte contendo dissulfureto ou tiol pode ser introduzido como um substituinte em R' por conversão do álcool em R' num éter por métodos químicos padrão. Por exemplo, o grupo hidroxilo primário de um anidroribitol protegido de forma apropriada (tal como protecção do diol por um grupo isopropileno), é posto a reagir com um excesso de um composto di-halogenado, tal como 1,3-dibromobutano, para dar um éter halogenado. Deslocamento do halogéneo com um tiol por reacção com tioacetato de potássio, seguido por tratamento com uma base suave ou hidroxilamina fornece o ribitol contendo o tiol. O grupo tiol pode ser convertido num dissulfureto de metilo ou piridilo por reacção com metanotiolsulfonato de metilo ou ditiopiridina respectivamente. Este método está descrito na USP 5 416 064, que é expressamente incorporada aqui:

A síntese de derivados maitansinóides pode ser descrita por referência às Figs. 1, 2, 3, 4(A) e 4(B), em que os ésteres maitansinóides contendo dissulfureto são preparados por condensação de maitansinol 1b com derivados N-netil-L-alanina ou N-metil-L-cisteína contendo um grupo dissulfureto e preparados na altura.

Ácidos omega-mercapto-carboxílicos de comprimentos de cadeia variáveis são convertidos nos metil-ditio respectivos e.g. 3a a 3d (onde $n=1-10$, incluindo alifáticos ramificados e cíclicos), ou derivados aril-ditio, e.g. 4a a 4b, por reacção com metanotiol-sulfonato de metilo ou arildissulfuretos, tais como difenildissulfureto e difenildissulfuretos substituídos no anel e dissulfuretos heterocíclicos tais como 2,2'-ditiopiridina. Os ácidos carboxílicos são activados e depois postos a reagir com N-metil-L-alanina para formar os compostos ácido carboxílico desejados, e.g. 5a a 5f para condensação com maitansinol 1b.

A esterificação de maitansinol 1b ou dum análogo com os ácidos carboxílicos 5a a 5f dá os maitansinóides contendo dissulfureto 6a a 6f. Clivagem do grupo dissulfureto em 6a a 6f com ditiotreitól dá os maitansinóides contendo tiol 6a a 6f, os quais se ligam facilmente via ligações dissulfureto ou tioéter aos agentes de ligação celular.

A remoção do grupo protector isopropilideno com ácido, seguido por oxidação com periodato, e reacção do dialdeído resultante com doxorubicina ou daunorubicina fornecerá a morfolino-doxorubicina ou daunorubicina contendo dissulfureto. Quando R ou R' não são um grupo ligante, o substituinte naquela posição pode ser variado até ser obtido um composto com a toxicidade desejada. A toxicidade elevada é definida como tendo um IC50

relativamente a células cancerosas de cultura no intervalo de 1×10^{-12} até 1×10^{-9} M, após um tempo de exposição de 72 horas. Exemplos representativos de substituintes são H, alquilo, e O-alquilo, como descrito acima. Um especialista ordinário na arte pode determinar a parte química apropriada para R e R' usando apenas experiências de rotina.

Por exemplo espera-se que substituintes metilo e metoxilo aumentem a potência citotóxica, enquanto não é esperado que um hidrogénio aumente a potência quando comparado com a doxorrubicina ou daunorrubicina precursora. Tipicamente serão inicialmente preparadas e avaliadas para citotoxicidade *in vitro* algumas doxorrubicinas ou daunorrubicinas modificadas representativas com substituintes em diferentes posições.

Os fármacos do invento doxorrubicinas/daunorrubicinas contendo dissulfureto ou contendo diol, podem ser avaliadas pela sua capacidade de suprimir a proliferação *in vitro* de várias linhagens de células não desejadas. Por exemplo, linhagens de células tais como a linhagem KH do carcinoma epidermóide humano, a linhagem SKBR3 do tumor mamário humano, e a linhagem Namalwa do linfoma Burkitt podem facilmente ser usadas para avaliação da citotoxicidade destes compostos. As células a ser avaliadas podem ser expostas aos compostos durante 72 horas e as fracções sobreviventes de células medidas em ensaios directos por métodos conhecidos. Os valores IC_{50} podem então ser calculados a partir dos resultados dos ensaios.

A eficácia dos compostos do invento como agentes terapêuticos depende da selecção cuidadosa de um agente de ligação celular apropriado. Agentes de ligação celulares incluem peptídeos e não peptídeos. Geralmente, estes podem ser anticorpos (especialmente anticorpos monoclonais), linfoquinas, hormonas, factores de crescimento, vitaminas, moléculas de transporte de nutrientes (tais como transferrina), ou qualquer outra molécula ou substância de ligação celular.

Exemplos mais específicos de agentes de ligação celular que podem ser usados incluem:

- fragmentos de anticorpos tais como sFv, Fab, Fab', e F(ab')₂ (Parham, 131, *J. Immunol.* 2895-2902 (1983); Spring et al., 113 *J. Immunol.* 470-478 (1974) ; Nisonoff et al, 89 *Arch. Biochem. Biophys.* 230-244 (1960));

- interferão (e.g. α, β, γ);

- linfoquinas tais como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;

- hormonas tais como insulina, TRH (hormonas de libertação de tirotropina), MSH (hormona de estimulação do melanócito), hormonas esteróides, tais como androgénios e estrogénios;

- vitaminas tais como ácido fólico

- factores de crescimento e factores de estimulação de colónias tais como EGF, TGF- α , G-CSF, M-CSF e GM-CSF (Burgess, 5 *Immunology Today* 155-158 (1984)); e

- transferrina (O'Keefe et al, 260 *J. Biol. Chem.* 932-937 (1985)).

As técnicas de anticorpos monoclonais permitem a produção de agentes de ligação celular extremamente específicos na forma de anticorpos monoclonais específicos. Particularmente bem conhecidas na arte são as técnicas para criar anticorpos monoclonais produzidos pela imunização de ratinhos, ratos, hamsters ou qualquer outro mamífero com o antigene que interessa tal como a célula alvo intacta, antígenos isolados da célula alvo, vírus intacto, vírus intacto atenuado, e proteínas virais tais como proteínas de revestimento viral. Podem ser também usadas células humanas sensibilizadas. Um outro método de criar anticorpos monoclonais é o uso de bibliotecas de fagos de sFv (região variável de cadeia única), especificamente sFv humana. (Ver e.g., Griffiths et al, USP 5 885 793; McCafferty et al, WO 92/01047; Liming et al, WO 99/06587).

A selecção do agente de ligação celular apropriado é uma questão de escolha que depende da população particular de células que é atacada, mas em geral são preferidos anticorpos monoclonais gerais, se estiver disponível um apropriado.

Por exemplo, o anticorpo monoclonal J5 é um anticorpo IgG_{2a} murino que é específico para o Antigene da Leucemia Linfoblástica Aguda Comum (CALLA) (Ritz et al, 283 *Nature* 583-585 (1980)) e pode ser usado se as células alvo expressarem CALLA tal como na doença Leucemia Linfoblástica Aguda. De forma similar, o anticorpo monoclonal anti-B4 é uma IgG₁ murina, que se liga ao antígeno CD19 nas células B (Nadler et al, 131 *J. Immunol.* 244-250 (1983)) e pode ser usado se as células alvo forem células B ou células doentes que expressam este antígeno tal como no linfoma não-Hodgkin ou leucemia linfoblástica crónica.

Adicionalmente, GM-CSF, que se liga a células mielóides, pode ser usado como agente de ligação celular para células doentes pela leucemia mielogénica aguda. IL-2, que se liga às células-T activadas, pode ser usado para prevenção de rejeição de enxerto transplantado, para terapia e prevenção da reacção enxerto-versus-hospedeiro, e para o tratamento de leucemia aguda de células-T. MSH, que se liga a melanócitos, pode ser usado para o tratamento de melanoma. O ácido fólico, que se dirige ao receptor folato expresso nos ovários e outros cancros é também um agente de ligação celular adequado.

Cancros da mama e testículos podem ser atingidos com sucesso com estrogénio (ou análogos de estrogénio) ou androgénio (ou análogos de androgénio) respectivamente como agentes de ligação celular.

Podem ser formados conjugados das doxorrubicinas/daunorrubicinas modificadas do invento e dum agente de ligação celular usando quaisquer técnicas presentemente conhecidas ou desenvolvidas ultimamente. Numerosos métodos de conjugação são ensinados em USP 5 416 064.

Os ésteres morfolino podem ser sintetizados para produzir um grupo amino livre e depois ligados a um anticorpo ou outro agente de ligação celular via um ligante lábil em ácido ou um ligante fotolábil. O morfolino (doxorubicina/daunorrubicina) contendo um grupo amino livre pode ser condensado com um peptídeo e subseqüentemente ligado a um agente de ligação celular para produzir um ligante lábil em peptidase. Morfolino (doxorubicina/daunorrubicina) contendo um grupo hidroxilo livre pode ser sintetizado a partir de doxorubicina/daunorrubicina e ribitol e depois succinilatado e ligado a um agente de ligação celular para produzir um conjugado que pode ser clivado por estearases intracelulares para libertar o fármaco livre. Com maior preferência, os éteres doxorubicina/daunorrubicina são tratados para criar um grupo tiol protegido ou livre, e depois as doxorubicinas/daunorrubicinas contendo o dissulfureto ou tiol são ligadas a um agente de ligação celular via ligações dissulfureto.

Conjugados representativos do invento são anticorpo-doxorrubicina/daunorrubicina modificada, fragmento de anticorpo-doxorrubicina/daunorrubicina modificada, factor

de crescimento epidérmico (EGF)-doxorubicina/daunorrubicina modificada, hormona de estimulação de melanócito (MSH)-doxorubicina/daunorrubicina modificada, hormona de estimulação da tiróide (TSH)-doxorubicina/daunorrubicina modificada, estrogénio-doxorubicina/daunorrubicina modificada, análogo de estrogénio-doxorubicina/daunorrubicina modificada, androgénio-doxorubicina/daunorrubicina modificada, análogo de androgénio-doxorubicina/daunorrubicina modificada, e folato-doxorubicina/daunorrubicina modificada.

Conjugados de doxorubicina/daunorrubicina modificada e anticorpos, fragmentos de anticorpos, hormonas proteicas ou peptídicas, factores de crescimento proteicos ou peptídicos e outras proteínas são feitos da mesma forma por métodos conhecidos. Por exemplo, peptídeos e anticorpos podem ser modificados com reagentes de ligação cruzada tais como 3-(2-piridiltio)propionato de N-succinimidilo, 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP), 4-succinimidil-oxicarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)-tolueno (SMPT), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato (SDPB), 2-iminotiolano, ou anidrido S-acetilsuccínico por métodos conhecidos. Ver, Carlsson et al, 173 *Biochem. J.* 723-737 (1978); Blatter et al, 24 *Biochem.* 1517-1524 (1985) ; Lambert et al, 22 *Biochem.* 3913-3920 (1983) ; Klotz et al, 96 *Arch. Biochem. Biophys.* 605 (1962); e Liu et al, 18 *Biochem.* 690 (1979), Blakey e Thorpe, 1 *Antibody, Immunoconjugates & Radiopharmaceuticals*, 1-16 (1988), Worrell et al 1 *Anti-Cancer Drug*

Design 179-184 (1986). O agente de ligação celular contendo tiol livre ou protegido assim derivado é então posto a reagir com uma doxorubicina/daunorrubicina contendo um dissulfureto ou tiol ou dissulfureto para produzir conjugados. Os conjugados podem ser purificados por HPLC ou filtração em gel.

De forma similar, por exemplo, os agentes de ligação celular estrogénio e androgénio tais como estradiol e androstenodiol podem ser esterificados no grupo hidroxilo em C-17 com um ácido carboxílico apropriado contendo dissulfureto usando, por exemplo, diciclo-hexilcarbodiimida como agente de condensação. Exemplos de tais ácidos carboxílicos que podem ser utilizados são ácido 3-(2-piridilditio)propanóico, ácido 3-metilditiopropanóico, ácido 4-(2-piridilditio)pentanóico, e ácido 3-fenilditiopropanóico. Esterificação do grupo hidroxilo em C-17 pode também ser conseguida por reacção com um grupo tiol protegido de forma apropriada contendo cloreto de ácido carboxílico tal como cloreto de 3-S-acetilpropanoílo. Podem também ser utilizados outros métodos de esterificação como descrito na literatura (Haslam, 36 *Tetrahedron* 2409-2433 (1980)). O androgénio ou estrogénio contendo tiol livre ou protegido pode então ser posto a reagir com uma doxorubicina/daunorrubicina contendo um dissulfureto ou tiol para produzir conjugados. Os conjugados podem ser purificados por cromatografia em coluna em sílica gel ou por HPLC. O ácido fólico pode ser condensado com uma hidrazida adequada tal como hidrazida do ácido 4-(2-piridilditio)pentanóico na

presença de um agente de condensação tal como diciclohexilcarbodiimida para dar uma hidrazona contendo um dissulfureto activo. O folato contendo dissulfureto pode então ser posto a reagir com uma doxorubicina/daunorrubicina contendo um tiol para produzir um conjugado que pode ser purificado por cromatografia em coluna em sílica gel ou por HPLC.

De preferência, conjugados anticorpo monoclonal- ou agente de ligação celular- doxorubicina/daunorrubicina são aqueles que estão ligados via uma ligação dissulfureto, como discutido acima, que são capazes de distribuir moléculas de doxorubicina/daunorrubicina. Tais conjugados de ligantes celulares são preparados por métodos conhecidos tais como por modificação dos anticorpos monoclonais com piridil-ditiopropionato de succinimidilo (SPDP) (Carlsson et al, 173 *Biochem. J.* 723-737 (1978)). O grupo tiopiridilo resultante é então deslocado por tratamento com doxorubicinas/daunorrubicinas contendo tiol para produzir conjugados ligados por dissulfureto. Alternativamente, no caso de aril-ditio-doxorubicinas/daunorrubicinas, a formação do conjugado de ligantes celulares é efectuada por deslocamento directo do aril-tiol da doxorubicina/daunorrubicina com grupos sulfidrílo previamente introduzidos nas moléculas de anticorpo. Os conjugados contendo 1 até 10 fármacos doxorubicina/daunorrubicina ligados via uma ponte dissulfureto são facilmente preparados por qualquer um dos métodos.

Mais especificamente, uma solução do anticorpo modificado com ditiopiridilo a uma concentração de 1 mg/ml em tampão fosfato de potássio 0,1 M, a pH 6,5 contendo EDTA 1 mM é tratado com a doxorubicina/daunorrubicina contendo o tiol (1,25 equivalente molar/grupo ditiopiridilo). A libertação de tiopridina a partir do anticorpo modificado é monitorizada espectrofotometricamente a 343 nm e está completa em cerca de 20 horas. O conjugado anticorpo-doxorrubicina/daunorrubicina modificada é purificado e libertado do fármaco que não reagiu e de outro material de baixo peso molecular por filtração em gel através de uma coluna de Sephadex G-25 ou Sephacryl S300. O número de partes doxorubicina/daunorrubicina modificadas ligadas por molécula de anticorpo pode ser determinado medindo a razão da absorvância a 280 nm e 490 nm. Uma média de 1-10 moléculas de doxorubicina/daunorrubicina modificada/molécula de anticorpo pode ser ligada via pontes dissulfureto por este método.

Podem também ser preparados conjugados anticorpo/doxorrubicina/daunorrubicina modificada com ligações não cliváveis. O anticorpo pode ser modificado com reagentes de ligação cruzada tais como 4-(maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), sulfo-SMCC, éster N-hidroxisuccinimida-*m*-maleimidobenzoílo (MBS), sulfo-MBS ou iodoacetato de succinimidilo, como descrito na literatura, para introduzir 1-10 grupos reactivos. Ver, Yoshitake et al, 101 *Euro. J. Biochem.* 395-399 (1979); Hashida et al, *J. Applied Biochem.* 56-63 (1984); e Liu et al, 18 *Biochem.* 690-697 (1979). O anticorpo modificado é então posto a

reagir com o derivado doxorubicina/daunorrubicina contendo tiol para produzir um conjugado. O conjugado pode ser purificado por filtração em gel através de uma coluna Sephadex G-25.

Os anticorpos modificados são tratados com as doxorubicinas/daunorrubicinas contendo tiol (1,25 equivalente molar/grupo maleimido). As misturas são incubadas durante a noite a cerca de 4°C. Os conjugados anticorpo-doxorubicina/daunorrubicina modificada são purificados por filtração em gel através de uma coluna Sephadex G-25. Tipicamente, estão ligadas 1-10 moléculas de doxorubicina/daunorrubicina modificada por anticorpo.

Um método preferido é o de modificar anticorpos com 4-(maleimidometil)-ciclo-hexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) para introduzir grupos maleimido seguido por reacção do anticorpo modificado com as doxorubicinas/daunorrubicinas contendo tiol para dar um conjugado ligado por tioéter. Novamente resultam conjugados com 1 até 10 moléculas de fármaco por molécula de anticorpo.

A citotoxicidade das doxorubicinas/daunorrubicinas modificadas e seus conjugados de anticorpo a linhagens de células não aderentes tais como Namalwa e HL-60 pode ser medida por retro-extrapolação das curvas de proliferação celular como descrito em Goldmacher et al, 135, *J. Immunol.* 3648-3651 (1985). A citotoxicidade destes compostos a linhagens de células aderentes tais como SKBR3 e KB podem ser determinadas por ensaios clonogénicos como

descrito em Goldmacher et al, *J. Cell Biol.* 1312-1319 (1986).

O presente invento também providencia uma composição terapêutica compreendendo:

(A) uma quantidade eficaz de uma ou mais doxorubicinas/daunorrubicinas modificadas como definido antes ligadas a um agente de ligação celular, e

(B) um veículo farmacêuticamente aceitável.

O agente citotóxico é preparado como descrito acima.

Os conjugados podem ser avaliados para potência *in vitro* e especificidade por métodos previamente descritos - ver R.V.J. Chari et al, 55 *Cancer Res.* 4079-4084 (1995). A actividade anti-tumoral pode ser avaliada em modelos de xenoenxerto de tumor humano em ratinhos por métodos descritos previamente (ver, C, Liu et al, 93 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 8618-8623 (1996)).

Veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados são bem conhecidos e podem ser determinados por especialistas ordinários na arte consoante a situação clínica justificar. Como usado aqui, os veículos incluem diluentes e excipientes.

Exemplos de veículos diluentes e/ou excipientes

adequados, incluem: (1) solução salina de Dulbecco tamponizada com fosfato, pH cerca de 7,4, contendo ou não contendo cerca de 1 mg/ml até 25 mg/ml de albumina de soro humano, (2) 0,9% de solução salina (0,9% p/v NaCl), e (3) 5% (p/v) dextrose; e pode também conter um antioxidante tal como triptamina e um agente estabilizador tal como Tween 20.

Exemplos de estados clínicos que podem ser tratados usando o composto ou composição do invento incluem malignidade de qualquer tipo incluindo, por exemplo, cancro do pulmão, mama, cólon, próstata, rim, pâncreas, ovários, e órgãos linfáticos; doenças autoimunes, tais como lupus sistémico, artrite reumatóide, e esclerose múltipla; rejeições de enxertos, tais como rejeição de transplante renal, rejeição de transplante de fígado, rejeição de transplante de pulmão, rejeição de transplante cardíaco, rejeição de transplante de medula óssea; reacção enxerto-versus-hospedeiro; infecções virais, tais como infecção mV, infecção por HIV, SIDA, etc.; e infecções parasitárias, tais como giárdia, amebiase, esquistossomose, e outras como determinado por um especialista ordinário na arte.

EXEMPLOS

O invento será agora ilustrado por referência a exemplos não limitativos. Salvo afirmação em contrário, todas as percentagens, proporções, partes, etc, são em peso.

EXEMPLO 1**SÍNTESE DA MORFOLINODOXORRUBICINA CONTENDO DISSULFURETO**

A síntese de uma morfolinodoxorubicina contendo dissulfureto representativa está mostrada esquematicamente na Figura 3. Ribitol (7), que está comercialmente disponível, é convertido em anidroribitol **8** por desidratação catalisada por ácido. A protecção do diol em **8** por conversão no isopropilideno **9**, seguido por reacção do grupo hidroxilo livre com cloreto de metanosulfonilo deu o mesilato **10**. A reacção de **10** com tioacetato de potássio produziu **11**. A hidrólise do tioéster com base, seguida por troca do tiol com dissulfureto em **12** com dissulfureto de metilo deu o composto metilditio **13**. O grupo protector isopropilideno foi então removido por hidrólise ácida para dar 5-metilditio-(1,4-anidro)ribitol (**14**). A oxidação do diol com periodato deu o aldeído **15**, o qual foi tratado *in situ* com doxorubicina na presença de cianoboro-hidreto de sódio para dar metilditiomorfolinodoxorubicina **16**.

EXEMPLO 2**ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE IN VITRO**

Os fármacos doxorubicina/daunorubicina contendo sulfureto, dissulfureto e sulfidriolo do invento podem ser avaliados pela sua capacidade de suprimir a proliferação de várias linhagens de células tumorais humanas *in vitro*. Duas

linhagens de células aderentes KB (carcinoma epidermóide humano) e SKBR3 (tumor mamário humano) e a linhagem de células não aderente, Namalwa (linfoma de Burkitt) são usadas para a avaliação da citotoxicidade destes compostos. As células são expostas aos compostos durante 72 horas e as fracções sobreviventes das células são medidas em ensaios directos. (KB e SKBR3 são avaliados para eficiência de plaqueamento (Goldmacher et al, 102 *J. Cell Biol.* 1312-1319 (1986) e Namalwa são ensaiados por retro extrapolação do crescimento (Goldmacher et al, 135 *J. Immunol.* 3648-3651 (1985)). Os valores de IC_{50} são então calculados a partir destes dados.

EXEMPLO 3

CONJUGAÇÃO DE ANTICORPOS

Conjugação de Doxorubicinas/daunorrubicinas contendo tiol com anticorpos via

Ligações dissulfureto: A conjugação de doxorubicinas/daunorrubicinas contendo tiol com anticorpos via ligações dissulfureto é realizada em dois passos. No primeiro passo os grupos ditiopiridilo são introduzidos em anticorpos usando piridilditiopropionato de succinimidilo (SPDP) como descrito por Carlsson et al. Os grupos tiopiridilo são então deslocados por reacção com a doxorubicina/daunorrubicina contendo tiol para produzir um conjugado.

Preparação de Conjugados Anticorpo-SS-Doxorrubicina/Daunorrubicina. Anticorpos anti-B4, anti-T9 e N901 são modificados com SPDP ou SPP como descrito na literatura. São introduzidos entre 1 a 10 grupos ditiopiridilo em média por molécula de anticorpo.

Uma solução de anticorpo modificado com ditiopiridilo a uma concentração de 1 mg/ml em tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5 contendo EDTA 1 mM a 25°C é tratado com uma doxorrubicina/daunorrubicina contendo tiol (1,25 equivalente molar/grupo ditiopiridilo). A libertação de tiopiridina do anticorpo modificado é monitorizada espectrofotometricamente a 343 nm e está completa em cerca de 20 horas. O conjugado anticorpo- doxorrubicina/daunorrubicina modificada é purificado e libertado de fármaco que não reagiu e de outro material de baixo peso molecular por filtração em gel através de uma coluna de Sephadex G-25. O número de moléculas de doxorrubicina/daunorrubicina modificada ligada por molécula de anticorpo é determinada medindo a razão entre as absorvâncias a 280 nm e 490 nm. Uma média de 1-10 moléculas de doxorrubicina/daunorrubicina modificadas por molécula de anticorpo pode ser ligada via ligações dissulfureto por este método.

Conjugação de Doxorrubicinas/Daunorrubicinas Modificadas Contendo tiol com

Anticorpos via uma ligação tioéter Não Clivável:

A conjugação de uma doxorrubicina/daunorrubicina contendo tiol é levada a cabo em dois passos. O anticorpo é primeiro

posto a reagir com maleimidometilciclo-hexano carboxilato de succinimidilo (SMCC) para introduzir grupos maleimido. O anticorpo modificado é então posto a reagir com a doxorubicina/daunorrubicina contendo tiol formando ligações tioéter.

Preparação de Conjugados de Anti-corpo-Doxorrubicina/Daunorrubicina modificada (Não-Clivável):Anticorpos, anti-B4, anti-T9, e N901 são modificados com SMCC como descrito na literatura.

Os anticorpos modificados são tratados com doxorubicina/daunorrubicina contendo tiol (1,25 equivalente molar/grupo maleimido). As misturas são incubadas durante a noite a 4°C. Os conjugados anticorpo-doxorrubicina/daunorrubicina modificada são purificados como descrito acima. Tipicamente, estão ligadas uma média de 1-10 moléculas de doxorubicina/daunorrubicina modificada por molécula de anticorpo.

EXEMPLO 4

OUTROS MÉTODOS DE LIGAR DOXORRUBICINAS/DAUNORRUBICINAS

Ligantes Lábeis em Ácido

Morfolino-doxorrubicinas/daunorrubicinas contendo um substituinte amino podem ser sintetizadas por métodos

padrão descritos na literatura química. Estas doxorubicinas/daunorubicinas contendo o grupo amino podem ser ligadas a anticorpos e outros agentes de ligação celular via um ligante lábil em ácido como descrito previamente (Blatter et al, 24 *Biochemistry*, 1517-1524 (1985), Patente EUA Nº^s 4 542 225, 4 569 789 e 4 764 368).

Ligante Fotolábil

Os derivados de doxorubicinas/daunorubicinas contendo o grupo amino descritas acima podem ser ligadas a agentes de ligação celular via um ligante fotolábil como descrito previamente. (Senter et al, 42 *Photochemistry and Photobiology*, 231-237 (1985), Patente EUA 4 625 014).

Ligante Lábil em Peptidase

As doxorubicinas/daunorubicinas contendo o grupo amino descritas acima podem ser também ligadas a agentes de ligação celular via ligantes peptídeo espaçador. Foi previamente mostrado que peptídeos espaçadores curtos entre fármacos e transportadores de proteínas macromoleculares são estáveis em soro mas são facilmente hidrolisados por peptidases lisossomais intracelulares (Trouet et al, 79 *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 626-629 (1982)). A doxorubicina/daunorubicina contendo o grupo amino pode ser condensada com peptídeos tais como Ala-Leu, Leu-Ala-Leu e Ala-Leu-Ala usando agentes de condensação tais como 1-[3-

(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida-HCl para dar um derivado peptídico de doxorubicina/daunorrubicina que pode ser então ligado aos agentes de ligação celular.

Ligante Lábil em Estearase

Morfolino-doxorrubicinas/daunorrubicinas podem ser esterificadas por reacção do grupo hidroxilo com anidrido succínico e depois ligadas a um agente de ligação celular para produzir um conjugado que pode ser clivado por estearases intracelulares para libertar o fármaco livre. (Para exemplos ver: Aboud-Pirak et al, 38 *Biochem. Pharmacol.* 641-648 (1989), Laguzza et al, 32 *J. Med. Chem.* 549-555 (1989)).

EXEMPLO 5

CULTURAS DE CÉLULAS E ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE IN VITRO

Células da linhagem de células da leucemia promielocítica humana, HL-60 (ATCC CCL 240) e a linhagem de células Namalwa do linfoma de Burkitt (ATCC CRL 1432) são cultivadas em culturas suspensas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal de vitelo e L-glutamina 2 mM. Todas as outras linhagens de células descritas abaixo são cultivadas como culturas aderentes. A linhagem de células do carcinoma epidermóide humano, KB (ATCC CCL 17),

linhagem de células de carcinoma renal humano A498 (ATCC HTB 44), linhagem de células do adenocarcinoma do cólon humano SW620 (ATCC CCL 227) e HT-29 (ATCC HTB 38) são cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal de vitelo e L-glutamina 2 mM. As células do carcinoma mamário humano SKBR3 (ATCC HTB 30) são cultivadas em DMEM suplementado com 15% de soro fetal de vitelo contendo glutamina 2 mM e a linhagem de células de adenocarcinoma dos ovários humano OVCAR3 (ATCC HTB 161) é cultivada em meio RPMI-1640 suplementado com 15% de soro fetal de vitelo contendo 10 µg/ml de insulina e L-glutamina 2mM.

São usados três anticorpos diferentes para conjugação via ligações dissulfureto a doxorubicina/daunorubicina contendo tiol. Os conjugados são preparados com os anticorpos anti-B4, que é contra o antígeno da célula B CD 19; anti-T9 (5E9) que é um anticorpo anti-receptor de transferrina humana, e N901 que é anticorpo anti-células tumorais de pulmão humanas.

Os ensaios de citotoxicidade são realizados nos respectivos meios descritos acima. A citotoxicidade das doxorubicinas/daunorubicinas modificadas e seus anticorpos conjugados a células HL-60 e Nmalwa é medida por retro extrapolação das curvas de proliferação celular. A citotoxicidade destes compostos para o resto das linhagens de células é determinada pelo ensaio clonogénico como descrito previamente.

Os conjugados são avaliados para citotoxicidade *in vitro* e são determinados os valores de IC_{50} para linhagens de células.

EXEMPLO 6

DETERMINAÇÃO DE AFINIDADE ESPECÍFICA DOS COMJUGADOS DE ANTICORPO-DOXORRUBICINA/DAUNORRUBICINA

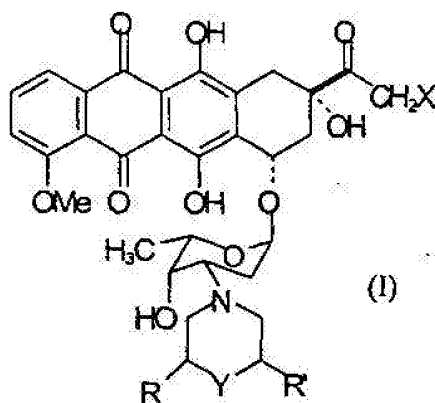
As afinidades específicas dos conjugados de N901-doxorrubicina/daunorrubicina modificada ligados por dissulfureto são analisadas por ensaios de ligação competitiva. A competição da ligação de anticorpo marcado com FITC às células NCI N417 e NCI H69 por conjugados de anticorpo não marcado e anticorpo-doxorrubicina/daunorrubicina modificada é determinada por imunofluorescência directa num Becton-Dickinson FACS. As duas linhagens de células são cultivadas como células aderentes em frascos de cultura de tecidos contendo meio essencial mínimo modificado de Dulbecco com 15% de soro fetal de vitelo. As células são então tripsinizadas e incubadas em suspensão, a 37°C, durante 30 minutos no mesmo meio em frascos de cultura de não tecidos para evitar a aderência das células ao plástico. As células são então transferidas para placas de 96 poços e tornadas a suspender em meio essencial mínimo contendo 25% de amostragem de soro humano. As suspensões de células (0,2 mL de suspensão contendo 100 000 células/poço) são incubadas

com anticorpo N901 marcado com FITC 6 nM, em concentrações variadas de conjugados de anticorpo não marcado ou doxorubicina/daunorrubicina modificada durante 1 hora a 0°C. As células são então lavadas uma vez com tampão e fixadas com formaldeído a 1% em solução salina tamponizada com fosfato. A fluorescência média das células é medida num FACS.

Lisboa, 22 de Janeiro de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Um composto compreendendo um grupo ligante R ou R' representado pela fórmula (I):



em que

em que,

X é H ou OH;

Y é O ou NR₂, em que R₂ é alquilo linear ou ramificado tendo 1 a 5 átomos de carbono;

R é um grupo ligante, H, ou alquilo linear ou ramificado tendo 1 a 5 átomos de carbono; e

R' é um grupo ligante, H, ou -OR₁, em que R₁ é alquilo linear ou ramificado tendo 1 a 5 átomos de carbono;

em que o grupo ligante é uma parte contendo um tiol ou dissulfureto, ou num éter morfolino é um grupo amino livre para ligar ao agente de ligação celular via uma ligação

lável em ácido ou fotolável ou para condensar com um peptídeo e ligar a um agente de ligação celular via uma ligação lábil em peptidase, ou é um grupo hidroxilo succinilatado para ligar ao agente de ligação celular via uma ligação lábil em estearase intracelular;

desde que R e R' não sejam grupos ligantes simultâneos.

2. O composto da reivindicação 1, em que X é H.

3. O composto da reivindicação 1, em que X é OH.

4. O composto da reivindicação 1, em que o grupo ligante é uma parte contendo tiol ou dissulfureto.

5. O composto de qualquer uma das reivindicações 1 e 4, em que a cadeia lateral contendo o grupo tiol ou dissulfureto é linear ou ramificada, aromática ou heterocíclica.

6. O composto de qualquer uma das reivindicações 1 e 4 ou 5, em que o grupo de ligação é $-(CH_2)_nSZ$, $-O(CH_2)_nSZ$, $-(CH_2)_nCH(CH_3)SZ$, $-O(CH_2)_nCH(CH_3)SZ$, $-(CH_2)_nC(CH_3)_2SZ$ ou $-O(CH_2)_nCH(CH_3)_2SZ$, em que Z é H ou SR^3 em que R^3 é linear, ramificado, ou alquilo cíclico tendo desde 1 até 10 átomos de carbono, ou arilo simples ou substituído tendo desde 1 até 10 átomos de carbono, ou heterocíclico, e n é um inteiro de 1 até 10.

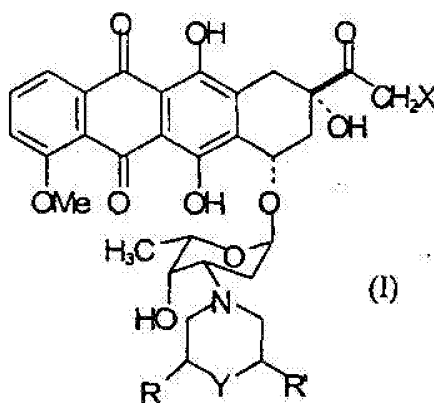
7. O composto da reivindicação 1, em que NR^2 é NCH_3 .

8. O composto da reivindicação 1, em que R' é $-\text{OCH}_3$.

9. O composto da reivindicação 1, em que quando R é H ou alquilo, R^1 é $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{Me})\text{SH}$ ou $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{Me})\text{SZ}$, ou em que quando R é CH_2SH ou $\text{CH}_2\text{CH}(\text{Me})\text{SZ}$ ou CH_2SZ ou $\text{CH}_2\text{CH}(\text{Me})\text{SZ}$, R' é H ou OR^1 .

10. O composto da reivindicação 1 em que R , R^1 ou R^2 são seleccionados a partir de metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-, iso-, s- ou t-butilo ou pentilo.

11. Um ou mais compostos ligados de forma covalente a um agente de ligação celular através de um grupo ligante, para usar como agente citotóxico em que pelo menos um dos ditos compostos é um composto compreendendo um grupo ligante R ou R' e é representado pela fórmula (I):



em que

X é H ou OH;

Y é O ou NR^2 , em que R^2 é alquilo linear ou ramificado tendo 1 a 5 átomos de carbono;

R é um grupo ligante, H, ou alquilo linear ou ramificado tendo 1 a 5 átomos de carbono; e

R' é um grupo ligante, H, ou $-\text{OR}_1$, em que R_1 é alquilo linear ou ramificado tendo 1 a 5 átomos de carbono;

em que o grupo ligante é uma parte contendo um tiol ou dissulfureto, ou num éter morfolino é um grupo amino livre para ligar ao agente de ligação celular via uma ligação lábil em ácido ou fotolábil ou para condensar com um peptídeo e ligar a um agente de ligação celular via uma ligação lábil em peptidase, ou é um grupo hidroxilo succinilado para ligar ao agente de ligação celular via uma ligação lábil em estearase intracelular;

desde que R e R' não sejam grupos ligantes em simultâneo.

12. Um ou mais compostos ligados de forma covalente a um agente de ligação celular através de um grupo ligante como reivindicado na reivindicação 11, em que um ou mais compostos que são de fórmula (I) são como definido em qualquer uma das reivindicações 2 até 10.

13. Um ou mais compostos ligados de forma covalente a um agente de ligação celular através de um grupo ligante como reivindicado na reivindicação 10 em que o agente de ligação celular é seleccionado a partir de peptídeos e não peptídeos, de preferência anticorpos, linfocinas, hormonas, factores de crescimento, vitaminas e moléculas que transportam nutrientes.

14. Composição para usar como agente terapêutico, compreendendo:

(A) uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais compostos ligados de forma covalente a um agente de ligação celular através de um grupo ligante para usar como agente citotóxico como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 11 até 13; e

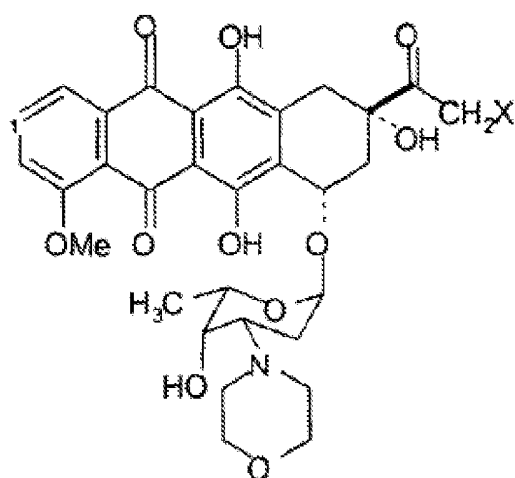
(B) um veículo farmacêuticamente aceitável

15. Um método de matar populações de células *in vitro* ou *ex vivo* em modelos para avaliar a potência e especificidade compreendendo pôr em contacto com células alvo ou tecido contendo células alvo com uma quantidade eficaz de um ou mais compostos ligados de forma covalente a um agente de ligação celular através de um grupo ligante para usar como agente citotóxico como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 11 até 13.

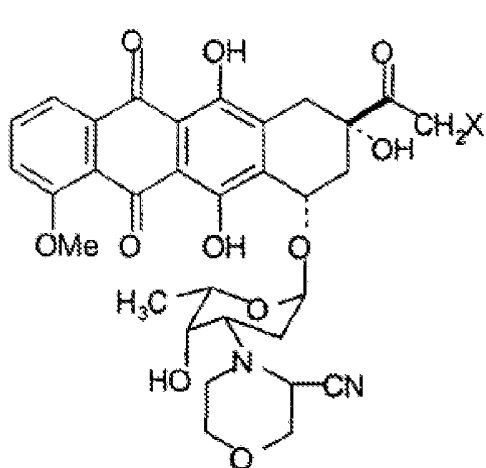
16. Uso de uma quantidade eficaz de um ou mais compostos ligados de forma covalente a um agente de ligação celular através de um agente ligante para usar como agente citotóxico como reivindicado nas reivindicações 11 como um ingrediente activo para a manufactura de uma composição para matar populações de células seleccionadas em células alvo ou tecidos contendo células alvo.

Lisboa, 22 de Janeiro de 2007

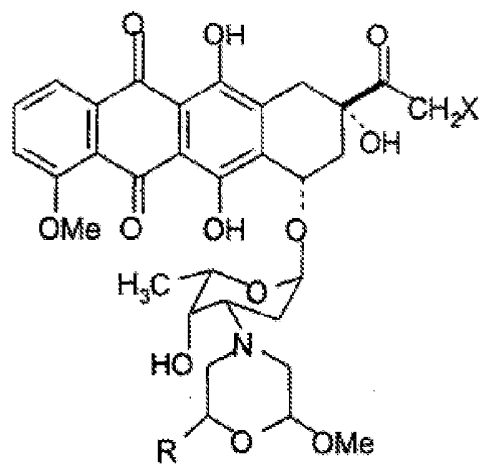
Figura 1



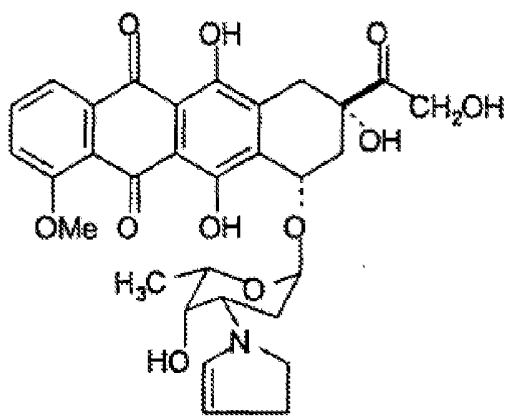
1. X=H; Compostos daunorrubicina
2. X=OH; Compostos doxorrubicina



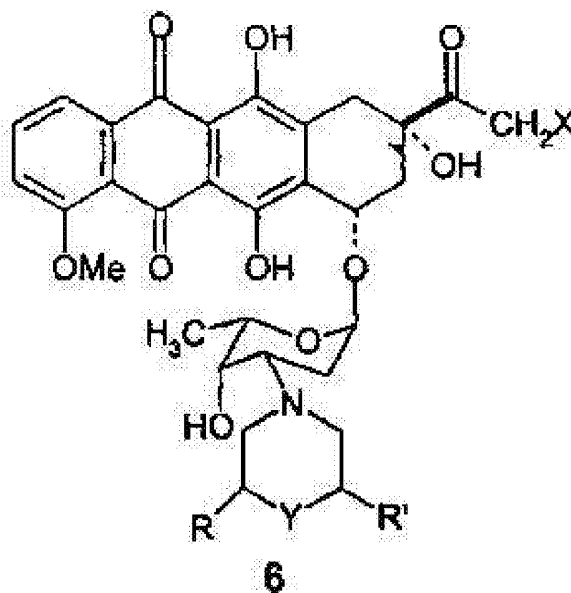
- 3a: X = H
3b: X = OH



- 4a: X = H, R = Me
4b: X = OH, R = Me



5

Figura 2

X=H; Compostos daunorrubicina

X=OH; Compostos doxorrubicina

Y	R	R'
O ou NR ₂	H ou alquilo	-OCH ₂ CH ₂ CH(Me)SH
O ou NR ₂	H ou alquilo	-OCH ₂ CH ₂ CH(Me)SSZ
O ou NR ₂	-CH ₂ SH ou -CH ₂ CH(Me)SH	-H ou -OR ₁
O ou NR ₂	-CH ₂ SSZ ou -CH ₂ CH(Me)SSZ	-H ou -OR ₁

R, R₁ e R₂ podem ser quaisquer alquilos lineares ou ramificados até 5 átomos de carbono: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-, iso-, s- ou t-butilo, pentilo.

Figura 3. Síntese de metilditiomorfolino-doxorrubicina